

**PATENT**  
Attorney Docket No. 209259

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Application of:

Hattori et al.

Art Unit: Unassigned

Application No. Unassigned

Examiner: Unassigned

Filed: February 12, 2001

For: STABLE PQQ-DEPENDENT GLUCOSE  
DEHYDROGENASE COMPOSITION

jc841 U.S. PTO  
09/781703  
02/12/01

**CLAIM OF PRIORITY**

Commissioner of Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

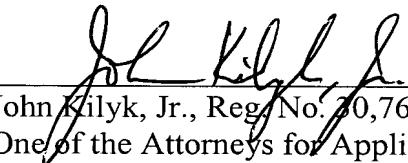
Dear Sir:

Applicant(s) in the above-identified application, through the undersigned attorney, hereby requests that the above-identified application be treated as entitled to the right accorded by Title 35, U.S. Code, Section 119, having regard to the application, which particulars are set out below:

In Japan, Application No. 2000-039857, filed February 17, 2000.

A certified copy of the priority document is enclosed.

Respectfully submitted,

  
John Kilyk, Jr., Reg. No. 30,763  
One of the Attorneys for Applicant(s)  
LEYDIG, VOIT & MAYER, LTD.  
Two Prudential Plaza, Suite 4900  
180 North Stetson  
Chicago, Illinois 60601-6780  
(312) 616-5600

Date: February 12, 2001

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

J.C.841 U.S. PTO  
09/781703  
  
02/12/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。  
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2000年 2月 17日

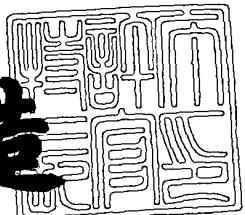
出願番号  
Application Number: 特願2000-039857

出願人  
Applicant(s): 東洋紡績株式会社

2001年 1月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3109099

【書類名】 特許願

【整理番号】 CN00-0081

【提出日】 平成12年 2月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社  
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 服部 静夫

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社  
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 曾我部 敦

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社  
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 竹嶋 誠嗣

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社  
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 川村 良久

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代表者】 津村 準二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000619

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	要約書	1
【ブルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 安定なPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ組成物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼに、(i)アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルコン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(ii)アルブミンを含有してなり、凍結乾燥されたことを特徴とする安定なPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

【請求項2】 PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼに、(i)アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルコン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(ii)アルブミンを共存せしめることを特徴とするPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼの安定な組成物に関する。

PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（以下、GDHともいう）は人工電子受容体を不可逆反応で還元することにより、グルコースの高感度定量に適している。

#### 【0002】

【従来の技術】

PQQ (Pyrrolo Quinoline Quinone) はデヒドロゲナーゼの第三の補酵素として、1979年に化学構造が決定されたが、メタノール資化性菌のメタノールデヒドロゲナーゼや酢酸菌のアルコールデヒドロゲナーゼやGDHを中心に、多くの生物において、主としてデヒドロゲナーゼでその存在が確認されている。

これらのデヒドロゲナーゼは人工電子受容体を還元できるので、ニトロブルーテトラゾリウムのような色素を用いると可視光で、しかも感度よく検出できること、およびNAD依存性デヒドロゲナーゼのように平衡反応ではなく一方向への反

応であるので、微量な化合物の定量に極めて有用であるとされている (Methods Enzymol. 第89巻、20 (1982))。

#### 【0003】

PQQを補欠分子族とする酵素の中で最も有用性の高いのは、PQQ依存性G DHであり、血糖の測定に用いることができる。実際の使用に関しては、通常の生化学試薬としての使用はもちろん、膜に固定したドライ試薬の呈色反応やチップに固定したセンサー用途等幅広く応用することが可能である。グルコースに同様に作用するグルコースオキシダーゼやNAD (P) 依存性G DHと比較し、溶存酸素の影響を受けないことや、反応がシンプルなためデバイスを簡単に、しかも安価にできることが特徴である。

#### 【0004】

その一方で、PQQ依存性G DHは、グルコース測定に用いられているグルコースオキシダーゼ、ヘキソキナーゼやNAD (P) 依存性G DHと比較すると安定性に問題があることが知られており、失活のメカニズムについては例えば Biochem.J., 261, 415(1989)で詳細に調べられている。該PQQ依存性G DHの安定化については、例えばPQQ (Arch. Biochim. Biophys., 218, 623(1982))、カルシウムイオンとグルタミン酸、グルタミン、リジンの併用 (特開平9-140378号公報) 等が報告されている。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上述のような安定化方法についての報告のほとんどが液状、例えば緩衝液中で検討されたものであり、診断薬原料である酵素の市場流通形態が一般的に粉末状（一部顆粒状）であることを考えると、必ずしも酵素製品の安定性に応用できるとは限らない。また液状での安定化に効果のある物質でも、タンパク質と混合すると吸湿しやすくなる化合物の場合、逆に安定性が低下する場合も珍しくない。すなわち、凍結乾燥等により粉末化されたPQQ依存性G DHについては、満足されるようなレベルの安定化方法が報告されていないのが現状である。

#### 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために種々検討した結果、(i)アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルコン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリオおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(ii)アルブミンを共存させ、凍結乾燥することによりPQQ依存性G DHの安定化の実現が可能であることを見出し、本発明に到達した。

すなわち、本発明は以下のよう構成からなる。

(1) PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼに、(i)アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルコン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(ii)アルブミンを含有してなり、凍結乾燥されたことを特徴とする安定なPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

(2) PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼに、(i)アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルコン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(ii)アルブミンを共存せしめることを特徴とするPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼの安定化方法。

## 【0007】

## 【発明の実施の形態】

本発明の一実施態様として、PQQ依存性G DHに、(i)アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルコン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリオおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(ii)アルブミンを含有し、凍結乾燥されたことを特徴とする安定なPQQ依存性G DH組成物がある。

本発明において用いられるG DHとは、EC 1. 1. 99. 17に分類される以下の反応を触媒する酵素である。

D-グルコース + 電子受容体 → D-グルコノ- $\delta$ -ラクトン + 還元型電子受容体

## 【0008】

本発明において、上記PQQ依存性G D Hは、例えば、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、グルコノバクター (*Glucoronobacter*) 属などの細菌、あるいは大腸菌などの微生物から採取されるもの、またはこれらの遺伝子を他の微生物に組み込まれた遺伝子組換え微生物より製造されたものなどがあり、また、遺伝子的に性質を改変したものを含有するが、アシネトバクター由来の可溶性G D Hの遺伝子組換え微生物より製造されたものや、その遺伝子を改変したもの用いることが望ましい。

## 【0009】

凍結乾燥組成物中におけるG D H含有量は、酵素の起源によっても異なるが、通常は約5～50%（重量比）の範囲で好適に用いられる。酵素活性に換算すると、100～2000U/mgの範囲で好適に用いられる。

## 【0010】

本発明に用いられるアスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、及び $\alpha$ -ケトグルコン酸の塩としては、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、及びマグネシウム等の塩が挙げられるが特に限定されるものではない。上記化合物とその塩及び $\alpha$ -シクロデキストリンの添加量は、1～90%（重量比）の範囲で添加することが好ましい。これらの物質は単独で用いてもよいし、複数組み合わせてもよい。

## 【0011】

凍結乾燥組成物に含有される緩衝液としては特に限定されるものではないが、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、GOOD緩衝液などが挙げられる。該緩衝液のpHは5.0～9.0程度の範囲で使用目的に応じて調整される。

凍結乾燥物中における緩衝剤の含有量は、特に限定されるものではないが、好ましくは0.1%（重量比）以上、特に好ましくは0.1～30%（重量比）の範囲で使用される。

## 【0012】

本発明において、使用できるアルブミンとしては、牛血清アルブミン（BSA）、卵白アルブミン（OVA）などが挙げられる。特にBSAが好ましい。該アルブミンの含有量は、好ましくは1～80%（重量比）、より好ましくは5～7

0% (重量比) の範囲で使用される。

【0013】

本発明において、凍結乾燥組成物には、さらに他の安定化剤などをG D Hの反応に特に悪い影響を及ぼさないような範囲で添加してもよい。

本発明の安定化剤の配合法は特に制限されるものではない。例えばG D Hを含む緩衝液に安定化剤を配合する方法、安定化剤を含む緩衝液にG D Hを配合する方法、あるいはG D Hと安定化剤を緩衝液に同時に配合する方法などが挙げられる。

【0014】

凍結乾燥法としては、特に制限されるものではなく常法に従って行えばよい。本発明の組成物は凍結乾燥物に限らず、凍結乾燥物を再溶解した溶液状態であってもよい。

本発明においては、P Q Q 依存性グルコースデヒドロゲナーゼに、(i)アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルコン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(ii)アルブミンを配合し、安定で、しかもハンドリングのよいグルコースデヒドロゲナーゼ凍結乾燥物として長期保存することが可能になった。

【0015】

本発明におけるG D H活性の測定は以下の測定条件で行う。

<試薬>

5.0 mM	P I P E S 緩衝液 (pH 6.5)
0.2 mM	P M S
0.2 mM	N T B
3.0. 6 mM	グルコース
0.19%	トリトンX-100

<測定条件>

上記試薬混液3 m l を37°Cで約5分間予備加温後、0.1 m l の酵素溶液を加え、緩やかに混和後、水を対照に37°Cに制御された分光光度計で、570 nm

mの吸光度を5分間記録し、その直線部分から1分間あたりの吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度を測定する。上記条件で1分間に $1/2 \mu\text{moL}$ のジホルマザンを生成する酵素量を1単位(U)とする。

## 【0016】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。なお、本発明は実施例により特に限定されるものではない。

## 【0017】

## (実施例1)

アシネットバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) N CIMB11517由来の可溶性PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼを溶解した20mM K-リン酸緩衝液(pH7.0)に下記表1に示される添加剤を溶解し、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物を室温で60分間放置後、37℃、1週間保存し、再溶解して酵素活性を測定した。凍結乾燥直後の残存活性(%)を100%として表1に示す。

## 【0018】

## 【表1】

	添 加 剂	残存活性(%)
1	BSA 50%	59
2	グルタミン酸 50%	62
3	$\alpha$ -サイクロデキストリン 50%	57
4	BSA 30%+グルタミン酸 30%	88
5	BSA 30%+ $\alpha$ -サイクロデキストリン 30%	77
6	BSA 30%+アスパラギン酸 30%	84
7	BSA 30%+ $\alpha$ -ケトグルタル酸 30%	85
8	BSA 30%+ $\alpha$ -ケトグルコン酸 30%	78
9	BSA 30%+リンゴ酸 30%	85

## 【0019】

表1に示すように、BSAとグルタミン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリン、アスパラギン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、または $\alpha$ -ケトグルコン酸を組み合わせること

とにより凍結乾燥物の安定性が向上した。

## 【0020】

## (実施例2)

アシネットバクター・カルコアセティカスNCIMB11517由来の可溶性PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼを溶解した1mM 塩化カルシウムを含む20mM PIPES酸緩衝液(pH6.5)に下記表2に示される添加剤を溶解し、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物を室温で60分間放置後、37℃、1週間保存し、再溶解して酵素活性を測定した。凍結乾燥直後の残存活性(%)を100%として表2に示す。

## 【0021】

## 【表2】

	添 加 剂	残存活性(%)
1	BSA 45%	72
2	BSA 30% + α-サイクロデキストリン 30%	82

## 【0022】

表2に示すように、実施例1で効果の優れていたBSA及びα-サイクロデキストリンもしくはリンゴ酸の組み合わせは、異なる緩衝液組成を用いても凍結乾燥状態で安定化される効果が認められた。

## 【0023】

## 【発明の効果】

上述したように、本発明において実施例から明らかなように、PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼを含む組成物中に、(i)アスパラギン酸、グルタミン酸、α-ケトグルタル酸、リンゴ酸、α-ケトグルコン酸、α-サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(ii)アルブミンを共存せしめることより、従来よりもはるかに安定な酵素組成物が得られる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 主として診断薬原料として用いられるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼの粉末状ないしは顆粒状での優れた安定化方法を提供する。

【解決手段】 PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼに、(i)アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルコン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(ii)アルブミンを含有してなり、凍結乾燥されたことを特徴とする安定なPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ組成物。

特2000-039857

出願人履歴情報

識別番号 [000003160]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

氏 名 東洋紡績株式会社